

Helsinki 18.11.2004

ETUOIKEUSTODISTITUS
PRIOORITY DOCUMENT



Hakija
Applicant

Uniq Bioresearch Oy
Ilmajoki

Patentihakemus nro
Patent application no

20031506

Tekemispäivä
Filing date

15.10.2003

Kansainvälinen luokka
International class

A23J

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä proteiinipitoisen tuotteen vahvistamiseksi ja
proteiinipitoinen tuote"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä
Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä,
pätevättaimuksesta, tiivistelmästä ja piirustuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the
description, claims, abstract and drawings originally filed with the
Finnish Patent Office.

Pirjo Kalla
Pirjo Kalla
Tutkimussihteeri

Maksu 50 €
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001
Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No.
1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and
Registration of Finland.

Osoite: Arkadiankatu 6 A Puhelin: 09 6939 500 Telefax: 09 6939 5328
P.O.Box 1160 Telephone: + 358 9 6939 500 Telefax: + 358 9 6939 5328
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

BEST AVAILABLE COPY

L1

Menetelmä proteiinipitoisen tuotteen vahvistamiseksi ja proteiinipitoinen tuote

Keksinnön kohteena on menetelmä proteiinipitoisten tuotteiden rakenteen vahvistamiseksi käytämällä muunnettua proteiinia tai muunnettua proteiinista tehtyjä fraktioita. Keksinnön kohteena on myös menetelmällä valmistettu proteiinipitoinen tuote.

Monet elintarvikkeet, hyvin proteiinipitoisetkin, tarvitsevat rakenteensa tueksi tukiaineen, jotta niiden rakenne saadaan kuluttajan vaatimusten mukaiseksi ja kestämään sellaisena käyttöön asti. Rakenteen kestävyydessä ilmenee viskositeetin alennemisena tai nestefasien eroamisena.

Yleisiä proteiinipitoisia elintarvikkeita ovat varsinkin maitopohjaiset tuotteet, yleensä vähärasvaiset tai rasvattomat, kuten jogurtit, viilit, vanukkaat, leivit, jäätelöt ja juomat. Niissä haluttu rakenne on saatu nostamalla proteiinipitoisuus riittävän korkeaksi, 6–12 %:iin ja kuumentamalla riittävän korkcassa lämpötilassa riittävän kauan, tai lisäämällä sakeuttamis- ja stabilointiainetta, liivatetta, modifiointimäärkelystä, pektiiniä, karrageenia, johanneksenlippupuujauhetta, guarkuria tms.

Yleisesti tunnetaan proteiinien geelinmuodostusta edistäviä ominaisuuksia ja näitä ominaisuuksia on tulittu laajalti. Kuitenkaan geelinmuodostuksen kaikkia mekanismeja ja tekijöitä ei täysin tunneta. Esimerkiksi erilaisilla maito- ja heraproteiineilla on omat, usein monimutkaisetkin roolinsa geelinmuodostuksessa syntyyvän proteiiniverkon muodostumisessa.

Tekniikan tason mukaisesti esimerkiksi jogurtin valmistuksessa on olennaista nostaa maidon proteiinipitoisuutta ja nykyisin käytössä olevien menetelmien mukaan vahvistaa rakennetta kuumentamalla. Valmistus aloitetaan maidon proteiinipitoisuuden nostamisella konsentroimalla maito haihduttamalla, kuumentamalla korkeudella nostamisella ja lämpötilassa riittävän pitkän aikaa tai lisäämällä maitojauhetta, tavallisesti rasvatonta maitojauhetta niin, että maidon kuiva-aineen määrä lisääntyy 8,5–9,0 %:sta 10,5–13,0 %:iin. Sopiva kuiva-aineepitoisuus määräytyy rasvapitoisuuden mukaan. Tässä vaiheessa lisätään muutakin tarpeellista ainesosat kuten rasva, sekä stabilointi- ja sakeuttamisaineet.

Seuraavassa prosessin vaiheessa esikäsitellyn maidon lämpötila nostetaan 50–65 °C:seen ja homogenisoidaan 150–200 barin paineessa. Tuloksena saadaan määältään enemmän rasvapalloisia, joiden pinnalla on kasiinimisellien osasia ja hera-

proteiineja. Samoin vapaana olevat kaseiinimisellit lisääntyvät. Kaseiiniosaset ja heraproteiinit, sekä rasvapallosten pinnalla eittä vapaat, osallisuvalt proteiiniverkon muodostukseen

5 Valmistusprosessin tärkeä vaihe on maitoproteiinien denaturointi kuumentamalla. Samassa yhteydessä vähennetään pilajabakteerien määrää hygieniatason säilyttämiseksi. Proteiinien denaturointi vaatii yleensä vähintään 85 °C:n lämpötilan ja 15-30 minuutin keston. Sama vaikutus saadaan myös korkeammilla lämpötiloilla ja lyhyemmilla käsittelyajoilla.

10 Kuumennuksen aikana toisena vaiheena proteiinien denaturoitumisen jälkeen, kun denaturoitumisessa on vapautunut varsinkin heraproteiineissa ja niistä β -laktoglobuliinissa sulphydryyli (SH) -ryhmiä, jotka saavat aikaan vaihtoreaktion SH- ja disulfidi (SS) -ryhmien välillä. Tämän reaktion seurauksena muodostuu heraproteiinilu, kappa-kaseiinin ja kaikkien seoksessa olevien proteiinien, joilla on rakenteessaan disulfidisidoksia tai ryhmiä, avaruusverkko, mikä ilmenee geeliitymisessä, kun pH laskee alle 5:n. Verkkorakenteen vahvuus riippuu eniten proteiinipitoisuudesta ja kuumennuksen vaikuttavuudesta. Verkkorakenne vahvistaa jogurtin rakennetta ja estää heran erottumista säilytyksen aikana.

15 20 Perinteinen heraproteiinien avulla suoritettu geelinmuodostus siis nojaa β -laktoglobuliinien suhlhydryyliryhmiin, joita on yksi jokaisessa β -laktoglobuliinin monomeerissä. Tämä on yleensä rajoittava tekijä geelinmuodostukseissa, sillä β -laktoglobuliinia on läsnä rajallinen määrä. Esimerkiksi heran sisältämässä α -laktalbumiinissa, joka on myös eräs määräältään suurimmista heran proteiinikomponenteista, ei ole vapaita sulphydryyliryhmiä. Vapaiden sulphydryyliryhmiiden määrää voidaan yrittää nostaa muilla keinoilla, mutta yleensä ne eivät ole käytökelpoisia esimerkiksi elintarviketeollisuudessa. Esimerkkinä tästä voidaan mainita Stevenson *et al.* (J. Agric. Food Chem. 1995, 44:2825-2828), jossa esitetään nauhan heran β -kaseiinin kemiallinen tilolointi, jolloin saadaan synteesinen proteiini, joka sisältää vapaita sulphydryyliryhmiä ja lukuisia disulfidisidoksia.

25 30

Myös kysteini pystyy avaamaan disulfidisidoksia SH ryhmän sisältävänä pienenä yhdisteenä, mutta sillä ei ole rakennetta vahvistavaa ominaisuutta itsellään, koska sillä puuttuu vahventavan proteiiniverkon muodostamisominaisuus, mihin vaaditaan vähintään kaksi SH-ryhmää. Lisäksi kysteini on tietyn konseptuaation jälkeen lääkelain alainen Suomessa, mikä rajoittaa sen käytömahdollisuuksia. Britanniassa suurin sallittu määrä on esimerkiksi taikinan valmistuksessa 70 ppm.

Jogurtin rakenteeseen vaikuttaa yleensä valmistuksen myöhemmissä vaiheissa pääasiassa hapattolla ja sen antamalla mahdollisella rakenteen tuella sekä sekoitukolla ja sen voimakkuudella.

5 Etenkin rasvattoman jogurtin ja viilin valmistuksessa joudutaan lisäämään proteiinin määriä enemmän kuin rasvan sisältävissä tuottcissa, koska siitä puuttuvat rasvapallosten pinnalla olevat kaseiinin ja heran proteiinit.

10 Kuurnennuksen seurauksena muodostuu kuitenkin monia sivumotteita, jotka alentavat proteiinien ravintoarvoa ja saattavat vaikuttaa nautittuna epäedullisesti esimerkiksi allergeneina (Walsura, P. *et al.* Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker 1999.).

15 Rakenteen vahvennukseen käytetyt sakeuttamis- ja stabilointiaineet eivät kuulu maidon omiin ainesosiin vaan ovat peräisin eläimistä eli ruohosista, kuten liivate, tai kasvien osista, kuten pektiini, karrageeni, guarkumi ym. eikä niillä ole merkittävää ravinnollista arvoa. Lisäksi tiettyjen eläinperäisten lisääaineiden, kuten liivatteiden, käyttöön voi liittyä terveydellisiä tai eettisiä seikkoja, jotka rajoittavat niiden käytötä.

20 On siis tarvetta uudenlaiselle menetelmälle elintarvikkeiden rakenteen vahvistamiseksi välttää tuotteen turhaa kuumentamista tai ylimääräisten sakeuttamis- tai stabilointiaineiden lisäämistä.

25 Yleisesti tunnetaan monia proteiinien, kuten esimerkiksi heraproteiinin, muuntamiseksi ja fraktioimiseksi. Eräs tällainen menetelmä on muuntaa proteiinin rakennetta niin, että proteiinien aminohappoketjujen väliset rikkisillat eli disulfidisidokset avautaisivat.

30 Yleensä tämä suoritetaan sulfonointireaktiolla, jolloin proteiinit saatetaan kosketuksiin sulfiitti ionien muodostavan reagensin kanssa proteiinien sulfonointiseksi. Tällöin käynnistyy hapetus-pelkistysreaktio, jossa proteiinin rikkisillan toinen rikki hapettuu sulfonaatiksi ja toinen pelkistyy sulphydryyliryhmäksi. Lisäämällä mukaan vielä hapettava tekijä hapettuvat vapaat sulphydryyliryhmät jälleen disulfidisidoksiiksi, jotka puolestaan jatkavat reaktiossa niin kauan, kunnes kaikki sulphydryyliryhmät ovat sulfonointuneet tai reaktion jokin muu tekijä on muodostunut rajoittavaksi.

35

Esimerkiksi julkaisuista FI101514 ja FI107116 tunnetaan menetelmiä proteiinien sulfonoimiseksi ja muuntamiseksi proteiinien eristämistä varten. Julkaisussa FI101514 esitetään menetelmä, jossa muunnetaan heran proteiinien rakennetta sulfonoinnin avulla ilman katalysaattoria. Julkaisussa ei esitetä spesifisiä käyttötarkoituksia tai sovellusmenetelmiä eristetyille proteiineille.

Julkaisussa FI107116 esitetään menetelmä proteiinien rakenteen muuntamiseksi saattamalla protiini kosketuksiin sulfittti-ioneja muodostavan reagenssiin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi ilman hapetinta. Laskemalla sulfonoidun proteiinin pH 10 happaman puolelle vapautuvat sulfonaattiryhmät proteiinista rikkidioksidiin, joka on poistettavissa liuoksesta puhaltamalla. Muunnetusta proteiinista osa saostuu alhaisessa pH:ssa ja osa jää liukoiseksi. Proteiini on otettavissa talteen joko saostuman ja liukoisen seoksesta, heran kokonaisproteiinina tai saostuma- ja liukoisen fraktiona ja niille suoritetaan mahdollinen jälkikäsittely. Tämä menetelmä perustuu siihen, että proteiinien muunnossa sulfityysi yksistään aiheuttaa jo riittävän disulfidisidosten aukeamisen eikä hapetus ole välittämätöntä protiinimolkyylin konformaation muuntamiseksi ja proteiinien saostamiseksi happamissa olosuhteissa. Hapetuksen poisjääminen yksinkertaistaa ja noppauttaa prosessia ja parantaa sen kannattavuutta.

20 Saostumafraktio sisältää α -laktalbumeinia, naudan seerumialbumiinia (BSA) ja jokin verran β -laktoglobuliinia. Liukoinen fraktio sisältää oleellisesti vain β -laktoglobuliinia. Kaikki proteiinit ovat muunnettuja ja niillä on parantuneet toiminnalliset ominaisuudet. Muunnetulla heraproteiinilla ja molemmilla fraktioilla on tietty otolliset sovelluskohdeet, kuten liukoisella fraktiolla kalvojen muodostuksesta ja muunnetulla sekä saostumafraktiolla emulgointi ja rakenteen vahvennus. Näistä kolmesta jalosteesta voidaan valita tilannekohdaisesti sovellutukseen tai tuotteen parhaiten sopiva. Lisäksi fraktoiden sisältämien eri proteiinien määriin voidaan vaikuttaa reaktio-olosuhteita muuttamalla, esimerkiksi nostamalla saostuksessa käytettävää pH:ta.

25

Julkaisun FI107116 menetelmässä proteiinien, kuten esimerkiksi hera- tai soijaproteiinien, disulfidisidosten avaaminen ja konformaation muunto saadaan aikaan sulfitysillä, jossa sulfittti-ioni reagoi spesifisesti disulfidisidoksen toisen rikin kanssa ja muodostaa S sulfonantijohdannaisen. Toinen rikki pelkistyy sylphydryylihyväksi. On edullista käyttää sulfittina alkaliometallin tai maa-alkaliometallin sulfittia, vety sulfittia tai metabisulfittia tai näiden yhdistelmiä. Käyttökelpoisimpia sulfitteja tässä menetelmässä ovat liukoiset ja elintarvikelaatuiset natriumsulfitti, natrium-

verysulfitti sekä natriummetabisulfitti, mutta myös muita soveltuivia sulfittiyhdisteitä voidaan käyttää. Kaikista edellä mainituista sulfiiteista muodostuu reaktiudosuhteissa valtaosaltaan natriumnsulfittia ja natriumvetysulfittia.

5 Tärkein muuntoasteeseen vaikuttava tekijä sulfityyssä on puolestaan sulfiitin määrä proteiinimäärästä kohti. Yllättäen on havaittu, että riittävä sulfiitin määrä on pienempi kuin mitä esimerkiksi FI107116 esittää. Keksinnön mukaisesti käytettävä sulfittilisä on natriummetabisulfittina noin 0,01–0,06 % (paino/tilavuus), kun proteiiniin määrä liuoksessa on 10–11 % (paino/tilavuus).

10 Tämä keksinnön tavoitteena on esittää uudentyyppinen menetelmä proteiinipitoisten tuotteiden, yleisesti elintarvikkeiden, rakenteen vahvistamiseksi käyttämällä muunnettua proteiinia, edullisesti heraproteiinia, missä muunnon tuloksena proteiini sisältää vapaita sulfhydryyli (SH) -ryhmiä (Kuva 1), jotka ovat peräisin proteiinissa alun perin ollcista disulfidisidoksista. Lyhyen lämpöökäsittelyn, kuten esimerkiksi pastöroinnin, tuloksena vapaat SH-ryhmät saavat aikaan vaihtoreaktion, jolloin muodostuu disulfidi (SS) -sidoksia ja proteiinit muodostavat avaruusverkon, joka tukee proteiinipitoisen tuotteen rakennetta. Nämä välitetään perinteisten menetelmien pitkä lämpöökäsittely, kuten esimerkiksi yleisesti käytetty 85 °C 15–30 min tai sitä vastaavaa käsittely (kuva 2).

15 Keksinnön mukaiselle menetelmälle ja tuotteelle on tunnusomaista, mitä on esitetty itsenäisissä patenttivaatimuksissa. Keksinnön eräitä edullisia suoritusmuotoja on esitetty epäitsenäisissä patenttivaatimuksissa.

20 25 Keksinnön tarkoituksesta on saada aikaan yksinkertainen menetelmä elintarvikkeen, edullisesti maitopitoisen elintarvikkeen, kuten esimerkiksi jogurtin, rakenteen vahventamiseksi maidon omien, ravinnollisesti arvokkaiden proteiinien avulla käytämättä korkeita lämpötiloja proteiinien rakenteen muuntaan/denatuointiin, missä yhteydessä tiedetään muodostuvan proteiinin ravintoarvoa heikentäviä yhdisteitä.

30 35 Elintarvikkeella tarkoitetaan tassa yhteydessä mitä tahansa syötäväksi kelpaavaa tuotetta tai sen esiasettettä niin ihmisten kuin eläintenkin käyttöön. Tavanomaisten elintarvikkeiden lisäksi elintarvike voi siis myös tarkoittaa esimerkiksi eläimille tarkoitettua rehua tai kotieläimen ruokaa. Elintarvike voi siis olla myös puolivalmis tuote tai sen esiaste, kuten esimerkiksi taikina.

Keksinnössä on oivallettu, että esimerkiksi julkaisun FI107116 mukaan valmistettua muunnettua ja fraktioitua heraproteiinia, voidaan käyttää protiinien rakenneenvahvistamiseen SH- ja SS-ryhmien vaihtoreaktion avulla. Muunnetussa heraproteiinissa ja heraproteiinifraktioissa, joita ovat maidon omia ainesosia, on vapaita SII-ryhmiä, jotka aiheuttavat vaihtoreaktion käynnistymisen ja nopeuden lisääntymisen, erityisesti pastörointilämpötilassa. Myös muun tyypistä proteiinia, kuten esimerkiksi soijaproteiinia, voidaan käyttää. Edellytyksenä on, että keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävissä protiinissa on alun perin ollut vähintään yksi disulfidisidos, joka voidaan avata muuntoreaktiossa vapaiden SH-ryhmien saamiseksi. Sellaiset proteiinit, joissa disulfidisidoksia tai ylimääräisiä SH-ryhmiä on keinotekoisesti luotu nativiiniproteiiniin, eivät kuulu keksinnön piiriin.

Keksinnön mukaisella menetelmällä minkä tahansa elintarvikkeen proteiinien, kuten esimerkiksi maidon tai maitotuoteen proteiinien, tai muiden syötävöksi kelpaa vien tuotteiden proteiinien, joissa on disulfidisidoksia, vahvistus voidaan suorittaa lisäämällä muunnettua proteiinia, esimerkiksi muunnettua heraproteiinia, sopiva määrä ja kuumentamalla sopiva aika, esimerkiksi pastörointilämpötilassa.

Keksinnön etuna on, että voidaan välttää elintarvikkeen voimakasta lämpökäsiteilyä, mikä voi huonontaa tuotteen makua tai ulkonäköä.

Lisäksi keksinnön etuna on, että saadaan rakenteeltaan vahvempia tuotteita.

Edelleen keksinnön etuna on, että saadaan proteiinipitoisuudeltaan parempia tuotteita.

Edelleen keksinnön etuna on, että voidaan välttää ylimääräisten sakuritamis- ja stabilointiaineiden käyttöä, esimerkiksi liivatteen ja karrageenin käyttöä.

Edelleen keksinnön etuna on, että saaduissa elintarviketuotteissa on funktioalaisia ominaisuuksia.

Edelleen keksinnön etuna on, että käytetään luonnollista alkuperää olevaa proteiinia.

Seuraavassa keksintöä selostetaan yksityiskohtaisesti elintarvikkeiden valmistukseen liittyvien esimerkkien avulla, joissa esitellään joitakin keksinnön suoritusmuo-

toja, mutta joita ei ole tarkoitettu rajoittamaan keksinnön suoja- ja suojapiiriä. Selostuksessa viitataan oheisiin piirustuksiin ja kuvaauksiin, joissa

Kuva 1 esittää muuntoraktiota

5

Kuva 2 esittää vaihtoraktiota ja vaihtomuuntoa, jossa vaihtoreaktiossa tapahtuu proteiini P_1 :n vaihtomuunto ja muunnettua proteiini P muodostaa alkuperäisen proteiini P_1 :n kanssa protiiniverkoston ensimmäisen vaiheen

10 Kuva 3 esittää sulfhydryyliryhmien hapettumista disulfidiryhmiksi, jolloin SII-ryhmät vähenevät ja SS-sidosten määrä lisääntyy ja verkoston rakenne vahvistuu

Kuva 4 esittää Amadorin yhdisteen muodostumista

15 Kuva 5 esittää lysinoalaniinin muodostumista lysiinistä ja dehydroalaniinista joko vapaana tai peptidin osana

Kuva 6 esittää akryyliamidiin neutralointia, jolloin muodostuu kysteiinin akryloylamidiijohdannainen, jossa ei ole akryylin kaksosissidusta

20

Edullinen proteiini käytetään myös keksinnön mukaisessa menetelmässä ja tulleessa on heraproteiini, kuten naudan heran proteiini, sillä sen biologinen arvo on erittäin korkea. Proteiinin biologinen arvo on suhdeluksi, kudoksen muodostukseen käytettyyn typen määrä suhteessa ruoasta imetyyneen typen määrään, mikä kuvaaa proteiinin laatuja.

Biologisen arvon määritelyksessä käytetään tavallisesti kananmunan proteiinia vertailuna ja sen arvoa merkitään 100:lla. Heraproteiinin arvo on silloin 104, lehmän maidon 91, kassiinin 77 ja soijan proteiinin 74.

30

Muunnettu heraproteiini on ravitsvuudeltaan alkuperäisen heraproteiinin verrattain, mutta sen ravitsemuksellista arvoa parantaa sen parempi sulavuus mahalaukussa. Heran pääasialliset proteiinit ovat β -laktoglobuliini, α -laktalbumiini, seerumin albumiini ja immunoglobuliini. Alkuperäisen, siis muuntamattoman, heraproteiinin

35

β -laktoglobuliini, jota on noin puolet heran proteiineista, ei sulaa/ hydrolysoudu käytännöllisesti katsoen olleukaan mahalaukussa ja muuttuu muuntamattomana ohutsuoleen. Tämä on tärkeä tekijä maitoallergian ilmenemiselle lapsilla.

Muunnettua proteiini tai proteiinifraktio sisältävät sulfhydryyliryhmiä, jotka aiheuttavat vaihtoreaktion ja sen seurauksena vaihtomuunnon. Vaihtomuunnon tuloksena on proteiinipitoisen tuotteen rakenteen vahvistuminen disulfidisidoksiin sisältävien proteiinien muodostaman avaruusverkoston tuloksena, kuten voidaan nähdä kuvassa

5 2. Siinä esitetään proteiini P₁:n vaihtomuunto vaihtoreaktiossa ja verkoston muodostumisen ensimmäinen vaihe. Muunnettua proteiini P muodostaa alkuperäisen proteiini P₁:n kaussa proteiiniverkoston ensimmäisen vaiheen. Reaktio jatkuu, kunnes verkosto on muodostunut. SH-ryhmien määrä pysyy samana, ellei SH-ryhmiä haluta vähentää hapettamalla ne disulfidisidoksiiksi. Hapettumista kontrolloinalla voidaan 10 säädellä halutunlaisen proteiiniverkoston muodostumista.

Muunnetun proteiinin ja proteiinifraktioiden vapaat sulfhydryyliryhmät tarjoavat useanlaisia suojavaikutuksia elintarvikkeissa ja myös esimerkiksi lemmikkieläinten ruoassa. Mainitut proteiinit ovat vaikuttelultaan antioksidantteja ja vaihtomuunnon tuloksena kasvi- ja mikrobi peräiset proteiinitoksiinit, joissa on disulfidisidoksiitit, menettävät toksisuutensa. Lisäksi muunnetut proteiinit estävät Maillardin reaktion alkupään yhdisteiden, kuten Amadorin yhdisteiden, ja lysiinoalaniinin muodostumista sekä neutraloivat mm. akryylijamidia ja muita akryylijohdannaisia (kuvat 2, 3, 4, 5 ja 6).

20 15 Maillardin reaktio on tapahtuma, jossa palkistävät sokrit, kuten glukoosi, fruktoosi, maltoosi tai laktoosi, reagoivat proteiineissa olevien aminoryhmien kanssa, jolloin proteiinin biologinen arvo laskee. Maillardin reaktion tuloksena syntyy monenlaisia tuotteita, jotka voivat vaikuttaa elintarvikkeen makua ja ulkonäköä huonontavasti sekä toimia allergeneinä.

25 20 Vaihtoreaktiossa proteiinin, edullisesti muunnetun heraproteiinin, vapaat SH-ryhmät aiheuttavat kuumennettaessa heraproteiinin tai minkä tahansa proteiinin SS-ryhmän avautumisen ja samalla uuden SS-ryhmän muodostumisen vapaan SH-ryhmän kanssa. Reaktion jatkuessa sopivan SH-ryhmisen määrän aikaansaamana tietyn ajan tuloksena on sopivanvahvuinen proteiinirakenne. Rakenneverkon muodostuksessa ovat mukana heraproteiinit ja kaseiinit vapaina liuoksessa sekä rasvarisaroiden pinnalla, missä proteiinit proteiiniverkkona toimivat emulgaattoreina.

30 35 Vaihtoreaktiossa SH-ryhmien määrä ei siis pienene. SH-ryhmien määrää voi pienentää hapettamalla ne esim. ilman hapella disulfidiryhmiksi $2 \text{SH} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{S-S} + \text{H}_2\text{O}$, mikä valvistaa edelleen tuotteen rakennetta (kuva 3).

Loppueroiteiden toiminnallisiin ja muihin ominaisuuksiin pystytään vaikuttamaan muuntoasteella eli avattujen disulfidisidosten määrällä suhtecissa prottiinin disulfidisidosten määrään. Käytötarkoituksesta riippuen vapaita SH-ryhmiä voi jäädä sopivan määrään tavoitteesta riippuen, koska SH ryhmät toimivat antioksidantteina, 5 neutraloivat vaihtomuuninolla kasveista tai mikrobeista peräisin olevia toksisia proteiiniyhdisteitä ja esimerkiksi akryyliamidia reagoimalla sen kaksoissidokseen kanssa (Friedman, M., J. Agric. Food Chem. 42 (1994) 3–20) (kuva 6). Lisäksi vapaat SH-syhmät estävät kemiallista ja entsymaattista tummumista sekä detoksi fioivat ja neutraloivat mm. homeen tuottamia aallatuksia. Ne myös sitovat nitriinia, kelatoivat hapettavia Cu^{2+} ja Fe^{2+} -ioneita sekä toksisia As^{3+} , Cd^{2+} , Co^{3+} , 10 Hg^{2+} , Pb^{2+} ja Se^{2+} -ionteita. Vapaita SH-ryhmiä sisältävän prottiinin avulla elintarvikkeesta voidaan siis muodostaa funktionaalinen eli terveysvaikuttavien tuotteiden, mikä keksinnön yhteydessä myös yllättäen havaittiin. Vapaille SH-ryhmille on 15 myös terapeuttisia ominaisuuksia, kuten esimerkiksi alkoholin aiheuttaman ruoansulatuskanavan limakalvon vaurioita parantavia ominaisuuksia (Loguercio C. et al. Gut 34 (1993) 161–165).

Vapaita sulfhydryyli-ryhmiä lisättäen valmistettavaan tuotteeseen laskettuna tuotteen kokonaisproteiinin määristä esimerkiksi 0,5–60 $\mu\text{mol/g}$ prottiinia, edullisesti noin 20 5–20 $\mu\text{mol/g}$ proteiinia, ennen vaihtomuuntoa. Tehdyissä kokeissa on havaittu, että kun vapaita SH-ryhmiä on vähintään tietty määärä, se havaitaan suhtecissa metallisena jälkimakuna. Kysteiinin SH-ryhmien maistuvuusraja jälkimakuna oli 30 ppm eli 25 $\mu\text{mol/l}$. Maistajista ei kukaan maistanut tätä määriä jälkimakuna rasvattomassa maidossa, maustamattomassa jogurtissa tai vahärasvaisessa viiliissä. Rasvattomassa 25 jogurtissa muunnetusta heraproteiinista peräisin olevat SH-ryhmät eivät maistuneet vielä pitoisuutena 30 $\mu\text{mol/g}$ proteiinia. Kuitenkin esimerkiksi jälkikasiteltäessä tuotetta myöhemmin, kuten steriloinnin aikana, voi siinä muodostua sivutuotteita, jotka reagoivat vapaiden SH-ryhmien kanssa vähentäen niitä ja samalla myös alentaten lopullista SH-ryhmien maistuvuuskynnystä. Tämä voidaan ottaa huomioon jo 30 perustuotteen vapaiden SH-ryhmien määriä suunniteltaessa.

Jogurtin valmistus perinteisellä tavalla rasvattomasta (rasvaa noin 0,05 %) maidosta vaatii yleensä maidon konsentroinnin vettä hajduttamalla niin, että kuiva-aineen määriä lisääntyy 2–3 prosenttiyksikköä eli saman määräin, minkä noin 2 % (noin 20 g/l) rasvattoman maitojauheen lisäys antaa.

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan samaan vaikutukseen päästääni lisäämällä rasvattomaan maitoon muunnetun heraproteiinin ja heraproteiinijauheen

seosta 0,8–1,6 prosenttiyksikköä (8–16 g/litra) proteiinina proteiinimäärien suhteessa 10–20 % muunnettua heraproteiinia ja 80–90 % 75-prosenttista heraproteiinikuusenraattia tai vastaava määrä tai osa esimerkiksi soijaproteiinijauhetta tai muuta proteiinivalmistetta. Jos halutaan valmistaa vähärasvaista jogurtta kasvisöljylisällä, 5 öljy (esimerkiksi 0,5–1,0 %) lisätään tässä vaiheessa. Vähärasvaisen maidon rakenteen vahvistamiseen tarvitaan pienemmät määrit, noin 0,6–1,0 prosenttiyksikköä proteiinia.

Muunnettua heraproteiini on koostumukseltaan kuten muuntamaton heraproteiini. 10 Muunnossa osa sen sisältämistä disulfididisoksista on avattu ja niistä on muodostunut vapaita SH-ryhmiä. Muunnetussa heraproteiinissa vapaiden SH-ryhmien määrä on yleensä noin 65–85 $\mu\text{mol/g}$ proteiinia, edullisesti noin 75 $\mu\text{mol/g}$ proteiinia, kuten jäljempänä olevissa esimerkeissä on käytetty.

15 Seos voidaan homogentoida lievästi esimerkiksi 50 °C:ssa ja 100 barin paineella ainesosien tasaisen jakautumisen varmistamiseksi. Lisättäessä rasvaa tai öljyä 0,5–1,5 % ravinnollisista syistä, esimerkiksi rypsiöljyä, oliiviöljyä, auringonkukkaöljyä, pellavansiemenöljyä tai vastaavaa terveysvaikuttista tuotetta, homogenisointi suoritetaan esimerkiksi 55–60 °C:ssa ja 150–200 barin paineella öljyn emulgiointiseksi 20 tarpeeksi pieniksi, alle 1 $\mu\text{m:n}$ tasakokoisiksi pallosiksi tai pisaroiksi.

Homogenoinnin jälkeen maito pastöroidaan esimerkiksi 75–80 °C:ssa 5–10 minuuttia vaihtoreaktion aikaansaamiseksi.

25 Kuumennuskäsittelyn jälkeen maito jäädytetään hapatteen siirrostus- ja hapatuslämpötilaan 42–45 °C:seen. Hapatus kestää 3–6 tuntia ja riippuu lämpötilasta ja hapatteena käytettyistä bakteeristä. Jogurtin happamisen lopetetaan pH:ssa noin 4,3–4,6, mistä se laskee vielä vähän jäädytyksensä ja säilytyksensä aikana. Jogurtin rakenne on vahvimmillaan pH:ssa 4,65, jolloin viskositettilkin on suurimmaan.

30

Hapatuksen jälkeen jogurtti jäädytetään alle 20 °C:seen ja sekoitetaan varovaisesti. Jogurtti pakataan pikareihin tai tölkkereihin ja jäädytetään säilytslämpötilaan 6–8 °C.

35 Eräään keksinnön suoritusmuodon mukaan rasvattoman viilin valmistus on mahdollista edellä kuvatulla tavalla käsitellystä maidosta. Rasvattomassa viiliissä rakenne jää yleensä heikoksi ja se heroittuu helposti. Vahventamalla rakennetta käyttämällä

vaihtomuuntoa heraproteiinilisän yhteydessä saadaan rakenteeltaan kestävää viiliä, joka ei heroitu. Viiliin voidaan lisätä terveellisiä tyydyttymättömiä öljyjä, kuten rypsi-, pellavansiemen- tai camelina-öljyä, joita muunnettuna ja vaihtomuunnettuna heraproteiini emulgoi homogenisoinnin tuloksesta. Viilin oma hapate toimii 20 °C:ssa ja tarvitsee aikaa happenemiseen yli yon tai 12–14 tunnia. Viilin piunalle kehityy viilin hapatteesta peräisin oleva tavanomainen valkosa ja samettimainen *Geothrichum*-valkohormekasvusto.

Yleensä vanukkaiden valmistuksen perusaineena on maito, johon lisätään sokeria ja makua antavat ainesosat sekä proteiinia sakeuttamiseen, gelatiinia tai heraproteiinia ja lisäksi pektiiniä, tärkkelystä/muunnettua tärkkelystä tai karrageeniä. Vielä erään keksinnön edullisen suoritusmuodon mukaan käytämällä vanukkaiden valmistuksessa vaihtomuunnettua heraproteiinia, saadaan ravinnollisesti arvokas proteiinilisä, joka toimii rakenteen vahvistajana kohtuullisella kuumennuksella ja yleisesti käytetyistä sakeuttamis- ja stabilointiaineista, kuten gelatiinista tai karrageenista voidaan luopua.

Proteiinipitoiset levitteet voidaan valmistaa maitopohjalle, kuten hapetetulle maidolle, mihin lisätään rasva, kuten margariini, heraproteiinia, mausteaineet ja sakeuttamisaineet. Keksinnön vielä erään edullisen suoritusmuodon mukaan muunnettuna heraproteiinin lisällä voidaan vahvistaa levitteen rakennetta ja saada ravitseva protoliinianos rakenteen vahvistuksen lisäksi. Samalla muiden sakentamisaineiden, kuten esimerkiksi yleisesti tähän tarkoitukseen käytettyjen karrageenin ja johannksenleipäpapujauheen, määritää voidaan vähentää tai poistaa kokonaan.

Taikinan valmistuksessa käytetään teknikan tasossa yleisesti kysteiinia taikinan vaivaamisen nopeuttamiseksi ja sekoiuksessa tarvittavan energiamääärän vähentämiseksi. Taikinan vaivauksella eli taikinan tehokkaalla sekoiuksella avautuu mekaanisesti vehnäjauhojen gluteenin disulfididiodksia. Kysteiinin lisäys helpottaa vaihtoreaktiolla disulfididiodosten avautumista ja taikinan pehmenemistä ja löysymistä, mikä on tarpeen leivän lopullisen rakenteen kannalta.

Taikinalla tässä tarkoitetaan mitä tahansa tunnettua leivonnassa tai elintarvikkeiden valmistuksessa käytetävää taikinaa, esimerkiksi leivän, leivonnaisten ja vastaanivien tekemiseen. Taikinan valmistamisessa käytetään edullisesti vehnäjauhoja taikinan rakenteen muodostajana, sillä vähässä on tarpeeksi gluteenia rakenteen ylläpitoon. Muita jauhoja kuten ruis-, ohra- tai kaurajauhoja voidaan käyttää lisänä ravinnolista tai makusyistä.

Kysteiinin käyttö on määrellisesti rajoitettu yleensä 70 ppm:aan. Kysteiinin käytön määäräksi suositellaan 35–70 ppm riippuen vchnän/jauhojen kovuudesta. Yliannostus luollaa tarittuvaan ja vaikeasti käsittelyvää taikinaa. Käytetyn kysteiinin ravinnollinen arvo on vähäinen.

5

Taikinan rakenteen vahventaminen muunnetulla heraproteiinilla onnistuu hyvin. SII-ryhmien yliannostukseen vaaraa ei ole ja lisätyllä proteiinilla on ravinnollistakin merkitystä. Heraproteiinijauhetta, proteiinipitoisuus 75 %, on käytetty taikinassa 2–4 %:n suuruisena lisänä jauhojen määrästä. Sillä saadut tulokset ovat olleet vähilevia käsittelystä riippuen. Muunnetua heraproteiinia on käytetty 1,5 %:n lisänä jauhojen määrästä proteiinina laskettuna ja sillä on ollut myönteinen vaikulus taikinan ominaisuuksiin.

Seuraavat esimerkit ja niihin liittyvät testit kuvaavat edellä esitettyä keksintöä soveltuuna crilaisten clintarvikkeiden valmistusprosesseihin käyttäen muunnetua heraproteiinia, jossa vapaiden SH-ryhmien määrä on noin 75 μ mol/g proteiinia. On kuitenkin huomattava, että mitä tahansa muuta soveltuvaa ci-syntetistä proteiinia voidaan myös käyttää.

20 Muunnetua heraproteiinia käytetään elintarvikkeiden valmistusprosesseissa aikaan saamaan vaihtomuuron avulla proteiinirakenteen vahventumisen muodostamalla avaruusverkon. Se toimii samalla periaatteella myös emulgaattorina, sulaa muunnon seurauksena ruoansulatuskanavassa muuntamatonta heraproteiinia helpommin ja se on ravintoarvoltaan yksi parhaimmista proteiineista.

25

Esimerkki 1

Rasvatonta jogurttia valmistettiin kolme kuostumukseltaan erilaista koenugypttää ja yksi vertailunäyte. Kaikki käsitteliin samalla tavalla.

30

Vertailunäyte sisälsi 980 ml rasvatonta maitoa ja 20,0 g rasvatonta maitojauhetta. Koenugypttä sisälsivät rasvatonta maitoa 920 ml ja 80 ml proteiiniseosta. Koenugypttä sisälsivät toisistaan muunnetun heraproteiinin määränpäin.

35

Koenugyptte I sisälsi muunnetua heraproteiinikonsentraamia 27 ml, missä oli proteiinipitoisuus 12 % ja 53 ml muuntamatonta heraproteiinikonsentraattia, minkä proteiinipitoisuus oli myös 12 %. 80 ml proteiiniseosta sisälsi proteiinia 9,6 g.

Koenäyte 2 sisälsi muunnettua heraproteiinikonsentraattia 20 % eli 16 ml ja muunmatonta heraproteiinikonsentraattia 64 ml.

5 Koenäyte 3 sisälsi muunnettua heraproteiinikonsentraattia samoin 16 ml ja muunmatonta heraproteiinikonsentraattia 64 ml. Tämä proteiiniseos kuumennettiin/pastöroitiin 78 °C:ssa 5 min.

10 Vertailu- ja koenäytteet pastöroitiin 78 °C:ssa 1–2 min ja jäähdytettiin 45 °C:seen. Hapate lisätiin tässä lämpötilassa ja hapateena käytettiin jogurtilihapateita 0,30 g/l (Yo-Mix VM 1-34; Danisco Cultor) Hapetus kesti 45 °C:ssa noin 7 tuntia, jolloin näytteet saavuttivat pH 4,4–4,5 happamuuden. Näytteet jäähdytettiin 5–7 °C:seen, muokattiin, pakattiin pikareihin ja pidettiin kylmässä 1 vuorokauden ennen määritystä. Näytistä mitattiin viskositeetti ja suutuntuma aistinvarainen arvointi, mihin sisältyi ulkonäkö, haju, rakenne, maku ja suutuntuma.

15 15 Näytteiden viskositeetti mitattiin viskosimetriillä Haage Visco-Tester 7R (kara R4, 50 rpm) 1–2 vrk valmistuksen jälkeen.

20 Näytiden viskositeetit olivat:

Vertailunäyte	Koenäyte 1	Koenäyte 2	Koenäyte 3
3300 mPa	3210 mPa	3130 mPa	2280 mPa

Aistinvarainen arvointi; asteikko 1–5; 5 arviojaa

Näyte	Ulkomuoto	Haju	Rakenne	Maku	Suutuntuma	Keskiarvo
Vertailunäyte	1,8	4,1	2,4	3,6	2,1	2,80
Koenäyte 1	2,5	1,1	2,9	3,1	2,8	3,08
Koenäyte 2	4,5	3,8	2,4	3,0	2,2	3,18
Koenäyte 3	4,2	3,9	4,3	3,6	4,0	4,00

25

Sanallinen kuvaus:

Vertailunäyte: rakeinen, paksu, mieto, hapan, ei pistävä jälkimakua

Koenäyte 1: rakeinen, löysähkö, hapan, kirpeä jälkimaku

Koenäyte 2: rakcinen, paksuhko, hapan, hieman pistävä jälkimakua

Koenäyte 3: rasainen, ohuin, hapan, hieman kirpeää jälkimakua.

Esimerkki 2

5

Rasvatonta jogurtta valmistettiin kaksi koenäytettä ja yksi vertailunäyte. Kaikki näytteet käsiteltiin samalla tavalla.

Vertailunäyte sisälsi 980 ml rasvatonta maitoa ja 20,0 g rasvatonta maitojauhetta.

10 Koenäytteissä oli 920 ml rasvatonta maitoa ja 80 ml proteiiniseosta. 80 ml:ssa proteiiniscosta oli 9,6 g proteiinia. Molempien koenäytteisiin lisättiin sama määrä muunnettua heraproteiinia. Koenäyte 1:een lisättiin vielä dehydroaskorbiinhappoa vapaiden SH-ryhmien hapettamiseksi disulfidiryhmiksi.

15 Koenäytteisiin lisättiin 80 ml proteiiniscosta sisälsi 15 % eli 12 ml muunnettua heraproteiinikonsentraattia ja 85 % eli 68 ml muuntamatonta heraproteiinikonsentraattia. Molempien konsentraattien proteiinipitoisuus oli 12 %.

20 Vertailu- ja koenäytteet pasteroitiin 80 °C:ssa 3 min ja jäähdytettiin 42 °C:seen. Koenäyte 1:een lisattiin 50 mg/l DHAH:ia (dehydroaskorbiinhappo), mikä hankittiin valmiina (Sigma) tai valmistettiin ohjeen mukaan (Tolbert, B.M. & Ward, J.B. 1982 Adv. Chem. Ser. No. 200, p. 101–123) ja pidettiin 30 min sekoinnaen 42 °C:ssa ja annettiin reagoida ennen hapatteeen lisäämistä.

25 Hapatteena käytettiin Yo-Mix VM 1-34 (Danisco Cultor). Hapate aktivoitiin lisäämällä 20 g sulatettua hapatetta 200 ml:aan 78 °C:ssa 3 min pasteroitua ja 42 °C:seen jäähdytettyä maitoa ja inkuboinnilla kaksi tuntia. Aktivoitua hapatetta lisättiin 3,0 ml 1 litraan jogurtimaitoa.

30 Maitoa hapattiin 42 °C:ssa, kunnes pH laski 4,3:een. Hapatuksen tarvittu aika oli 1,5 tuntia. Kaikki näytteet saavuttivat vaaditun happamuuden lähes samanaikaisesti eli happeneminen tapahtui kaikissa näytteissä yhü nopeasti.

35 Näytteet jäähdytettiin 4 °C:seen, muokattiin sckoittamalla tasalaatuiseksi, pakattiin pikareihin ja säilytettiin kylmässä. Näytteistä mitattiin viskositeetti Haage Visco-Tester 7R:llä (kara R 4 50 rpm.) 1 vrk valmistukseen jälkeen.

Näytteiden viskositeetit olivat

Vertailunäyte	Koenäyte 1	Koenäyte 2
3300 mPa	2300 mPa	2300 mPa

Koenäytteiden maku oli hapan eikä pistävä metallista jälkimakua ollut.

5

Esimerkki 3

10 Rasvatonta jogurttia valmistettiin kolme koenäytettä ja yksi vertailunäyte. Vertailunäyte sisälsi rasvatonta maitoa 980 ml ja rasvatonta maitojauhetta 20,0 g. Koenäytteiden koostumus oli kaikilla sama, 920 ml rasvatonta maitoa ja 80 ml proteiiniseosta, mistä muunnetun heraprotteiinin osuus oli 15 % eli 12 ml proteiinipitoisuudeltaan 12 %:a proteiiniseosta. Kaikilla näytteillä oli erilainen kuumennuskäsinvety.

15 Vertailunäyte pastöroitiin 90 °C:ssa 15 min, koenäyte 1 80 °C:ssa 5 min, koenäyte 2 80 °C:ssa 10 min ja koenäyte 3 80 °C:ssa 15 min. Kaikki näytteet jäähdytettiin 12–45 °C:seen.

20 Hapate lisättiin 42–45 °C jogurttimaitoon. Hapateena käytettiin Valio Oy:n valmistamaa maustamatonta jogurtta. Sitä lisättiin 4 % eli 40 g/l. Jogurtti hapattiin hapemuuteen pH 4,6. Hapatusaika oli 4–5 tuntia.

25 Näytteet jäähdytettiin 4 °C:seen, muokattiin sekoittamalla tasarakenteiseksi ja pakattiin 2 dl:n pikareihin. Pikarit säilytettiin kylmässä 4 °C:ssä.

Näytteiden hapatusaika kunnes pH oli 4,6:

Vertailunäyte	Koenäyte 1	Koenäyte 2	Koenäyte 3
5 h	4 h 20 min	4 h 15 min	4 h 30 min

30 Näytteistä mitattiin viskositeetti Haage Visco-Tester 7R:llä (kara R 4 50 rpm) ja suoritettiin aistinvarainen arvointi 1 vrk valmistuksen jälkeen.

Näytteiden viskositeetit olivat

Vertailunäyte	Koenäyte 1	Koenäyte 2	Koenäyte 3
3900 mPa	3600 mPa	3000 mPa	3800 mPa

Aistinvarainen arvointi; astcikko 1–5; 5 arvioijaa:

5

Näyte	Ulkomuoto	Haju	Rakenne	Maku	Suutuntumia	Keskiarvo
Vertailunäyte	4,9	4,1	4,1	3,6	4,0	4,2
Koenäyte 1	4,8	4,2	4,1	4,0	3,9	4,2
Koenäyte 2	4,8	4,1	4,2	4,3	5,0	4,5
Koenäyte 3	4,6	4,1	3,8	4,2	4,2	4,2

Sanallinen kuvaus

Vertailunäyte: sileä, hapan, piimämäinen, ei raikas, venyvä

Koenäyte 1: sileä, tasainen, voimakkaan hapan, piimämäinen, raikas, pihmeä, pistävä jälkimaku

Koenäyte 2: sileä, tasainen, voimakkaan hapan, piimämäinen, raikas, pihmeä

Koenäyte 3: sileä, tasainen, hapan, piimämäinen, raikas, hapan.

15 Esimerkki 4.

Rasvatonta jogurtta valmistettiin kaksi koennäytettä ja vertailunäytte. Vertailunäyte sisälsi rasvatonta maitoa 980 ml ja rasvatonta maitojuuhetta 20.0 g. Koenäytteiden koostumus poikkesi vain vähän toisistaan. Koenäyte 1 sisälsi 11 g/l kylmäkuivattua proteiiniseosta, missä oli muunnetun proteiinin osuus 15 % kokonaisproteiinista 9,6 g:sta. Koenäyte 2 sisälsi saman määrän proteiiniscosta litrassa, mutta se liuotettiin ensin 80 ml:aan ventä ja lisättiin maitoon liuraksi.

Vertailunäyte pastöroitiin 90 °C:ssa 15 min. Koenäyte 1 ja 2 pastöroitiin 80 °C:ssa 25 min. Kaikki näytteet jäähdytettiin 42–45 °C:seen.

Hapatteena käytettiin Valio Oy:n valmistamaa maustamatonta jogurttia. Sitä lisättiin 4 % eli 40 g/l 42–45 °C:seen jäähdytettyn jogurttimaitoon ja hapattiin pH 4,5 happamuuteen. Hapatusaika oli noin 4 tuntia.

30

Näytteet jauhdettiin 4 °C:seen, muokattiin sekoittamalla tasarakenteiseksi ja pakattiin 2 dl:n pikareihin. Pikarit säilytettiin kylmiössä 4 °C:ssa.

5 Koenäytteistä 1 ja 2 osa ajettiin homogenisaattorin läpi ilman painetta. Alkuperäisistä ja homogenisaattorin läpi ajetuista näytteistä (koenäyte 1/p ja 2/p) mitattiin viskositeetit Haage Visco-Tester 7^R:llä (kara R4 50rpm) ja suoritettiin aistinvarainen arvioin 1 virk valmistuksen jälkeen.

10 Näytteiden viskositeetit olivat:

Vertailunäyte	Koenäyte 1	Koenäyte 2	Koenäyte 1/p	Koenäyte 2/p
4400 mPa	3900 mPa	3700 mPa	1150 mPa	1900 mPa

Aistinvarainen arvointi; asteikko 1–5; 5 arvioijaa:

Näyte	Ulkomuoto	Haju	Rakenne	Maku	Suutuntuma	Keskiarvo
Vertailunäyte	4,4	4,4	3,9	4,2	3,9	4,2
Koenäyte 1	4,8	4,4	4,3	4,1	4,2	4,4
Koenäyte 2	4,8	4,2	4,4	4,2	4,2	4,4
Koenäyte 1/p	5,0	4,1	3,6	3,6	2,8	3,9
Koenäyte 2/p	5,0	4,2	4,4	4,4	4,1	4,4

15

Koenäytteiden rakenteiden paksuudessa ei ollut merkittävillä eroavuuutta. Koenäytteet koettiin jopa paksummaksi kuin vertailujogurtti. Rakenne oli jokaisessa näytteessä samankaltainen, hieman venyvä ja paksu.

20

Koenäyte 1/p oli rakenteeltaan hieman vetinen ja maussa havaittiin jokin sivumaku. Koenäyte 2/p mielelläni paksuudeltaan sopivaksi, suutuntuma oli puhueellu jogurttimainen ja maku raikas. Arvointiyhteenvedon mukaan näyte oli sarjan parhaimpia.

Eslmerkki 5

Rasvatonta viiliä valmislettiin kolme koenäytettä ja yksi vertailunäyte. Vertailunäytte sisälsi rasvatonta maitoa 980 ml ja rasvatonta maitojauhetta 20,0 g. Koenäytteet sisälsivät 920 ml rasvatonta maitoa ja 80 ml proteiiniseosta, mistä muunnetun heraproteiinin osuus oli 15 % eli 12 ml proteiinipitoisuudeltaan 12 %:a protciiniscosta. Loppu 85 % oli muunmatonta heraproteiinikonsentraattia.

5 Kaikki näytteet pastöroitiin 78 °C:ssa 1–2 min. Pastöroinnin jälkeen koenäytteisiin 1 ja 2 lisättiin DHAH:a (dehydroaskorbiinhappoa). Koenäyte 1 jäähdytettiin 42 °C:seen. DHAH:a lisättiin 25 mg/litra ja lämpötila pidettiin 30 min. Koenäyte 2 jäähdytettiin 35 °C:seen. DHAH:a lisättiin 50 mg/litra ja pidettiin 30 min. Kaikki näytteet jäähdytettiin lopuksi 20 °C:seen.

10 15 Hapatte lisättiin 20 °C:iseen viilimaitoon. Hapatteena käytettiin 5 % eli 50 g/litra Valio Oy:n valmistamaa maustamatonta viiliä, mikä sisälsi rasvaa 1 %. Seos sekotettiin hyvin ja annosteltiin 2 dl:n pikareihin ja hapattettiin yli yön 20 °C:ssa. Hapaniksen jälkeen valmis viili siirrettiin kylmiöön 4 °C:seen.

20 25 Aistinvarainen arvointi; asteikko 1–5; 5 arvioijaa:

Näyte	Ulkonäkö	Haju	Rakenne	Maku	Suutuntuma	Keskiarvo
Vertailunäyte	4,0	5,0	3,0	4,2	4,3	4,1
Koenäyte 1	4,0	5,0	3,0	4,2	4,3	4,1
Koenäyte 2	4,0	5,0	4,0	4,4	4,5	4,4
Koenäyte 3	4,0	5,0	4,5	4,3	4,5	4,5

Jokaisen pikarin pinnalla oli hieman epätasaisesti jakautunut *Geothrichum*-homekasvusto. Rakenne oli kaikissa näytteissä jämäkkä, eikä irronnut ylösalaisin käänneystä pikarista.

25 30 Vertailunäyte: pinta himmeä, rakeinen, löysähkö, maku hyvä; Koenäyte 1: pinta himmeä, rakeinen, löysähkö, maku hyvä; Koenäyte 2: pinta kiiltävä, lusikalla tichty kuoppa pysyy suhtcellisesti hyvinä, maku hyvä;

Koenäyte 3: pinta kiiltävä, paras näytteistä, lohkeava, kuoppa pysyy hyvänsä, maku hyvä.

5 Esimerkki 6

Rasvatonta jogurtia valmistettiin kaksi koenäytettä. Koenäytteisiin lisätty proteiinin määrä oli näyte A:ssa 10 g proteiinia/litra ja näyte B:ssä 13 g proteiinia/litra. Proteiiniseos valmistettiin viin, eua 80 ml sisälsi proteiinia noin 10 g. Siitä 15 % (12 ml), 10 joka sisälsi 1,5 g proteiinia, oli muunnettu heraproteiinia (Erä P75) ja 85 % (68 ml), joka sisälsi 8,5 g proteiinia, oli heraproteiinikonsentraatia (Juustokaira Oy, Kuusamo). Näillä painosuhteilla valmistettu liuos kylmäkuivattiin jauheksi. Tätä jauhetta tarvittiin 12 g 10 g:n proteiinilisäksi.

15 Näyte A:han punnittiin proteiiniseosjauhetta 12 g/litra ja näyte B:hen 15,6 g/litra. Proteiiniseosjauhe sekoitettiin huolellisesti rasvattomaan maitoon litraksi. Jauhe sekoittui ja liukeni hyvin huononlämpöisessä maitoon. Tämän jälkeen koenäytteet pastöroitiin 80 °C:ssa 15 min ja jäähdytettiin 43 °C:seen.

20 Hapatteena käytettiin Valio Oy:n tuottamaa maustamatonta jogurtta 4 % (0,5 litran tölkki, Tampere). Hapatus tapahtui 43 °C:ssa. 4,5 tunnin jälkeen näytteiden pH oli saavuttanut 4,6 ja hapatus lopetettiin. Näytteet jäähdytettiin 20 °C:seen, muokattiin sekoittamalla ja siirrettiin jääräkappiin.

25 Koenäytteistä määritettiin SH-ryhmät, $\mu\text{mol/g}$ proteiinia Ellmanin reagenssilla:

Koenäyte/ SH $\mu\text{mol/g}$ proteiinia	A	B
Rasvaton maito + proteiiniseos	10,3	11,4
Pastöroinnin jälkeen	13,9	14,5

Koenäytteistä määritettiin viskositetti vuorokauden jälkeen valmistuksesta 10 °C:ssa Brookfield DV 1 Viscometer -laitteella (Kara 3, kiertosnopeus 12). Näytteiden viskositeetit olivat

Koenäyte/viskositetti	A	B
mPas	8000	8600

Aistinvaraisen arvion mukaan näytteet olivat lähes samanlaiset; rakenne oli tasainen ja paksu sekä maku samettisen pehmeän.

5 Esimerkki 7

Rasvatonta jogurtta valmistettiin kolme kootuilleisiin lisäällä proteiiniseoksen määrä oli näyte A 10 g proteiinia/litra, näyte B 12,5 g proteiinia/litra ja näyte C 15,0 g proteiinia/litra. Proteiinicos valmistettiin sekoittamalla heraproteiijauhetta, proteiinipitoisuus 75 %, (Juustokaira Oy, Kuusamo) ja muunnettua heraproteiinia (Erä P75) kylmäkuivattuna niin, että proteiinimäärien suhde oli 85 % heraproteiinijauhetta ja 15 % muunnetun heraproteiinin jauhetta. 10 g:aan proteiinia tarvittiin seosta 13,0 g.

15 Näyte A:han punnitun proteiiniscoksen määrä oli 13,0 g/litra, näyte B:hen 16,2 g/litra ja näyte C:hen 19,4 g/litra. Proteiiniseokset sekoitettiin huolellisesti rasvatomaan maiteon litraksi. Ne sekoituvat ja liukuvat hyvin maiteoon. Tämän jälkeen näytteet pastöröitiin 80 °C:ssa 15 min ja jäähdytettiin 4,3 °C:seen.

20 Hapatteena käytettiin Valio Oy:n tuottamaa maustamaton jogurttia 4 % (0,5 litran tölkki, Tampere). Hapatus tapahtui 43 °C:ssa 4 tuntia, jolloin näytteiden pH:t olivat 4,6. Näytteet jäähdytettiin 20 °C:seen, muokattiin sekoittamalla ja siirrettiin jääkaappiin.

25 Koenäytteistä määritettiin SH-ryhmät, $\mu\text{mol/g}$ proteiinia Ellmanin reagenssilla:

Koenäyte/ SH $\mu\text{mol/g}$ proteiinia	A	B	C
Rasvaton maite + proteiiniseos	12,7	13,4	14,0
Pastöröinnin jälkeen	14,8	15,5	18,6

Koenäytteistä määritettiin viskositeetti yhden vuorokauden jälkeen valmistuksesta 20 °C:ssa Brookfield DV 1 Viscomeeter -laitteella (Kara 3, kierrosnopeus 12).

30 Näytteiden viskositeetit olivat

Koenäyte/viskositteetti	A	B	C
mPas	3700	3800	4000

Kaikki näytteet olivat rakenteeltaan tasaisia ja kiinteitä; maku oli miellyttävän rai-
kas ja samettisen pehmeä.

5

Esimerkki 8

Rasvatonta seosjogurttia valmistettiin kolme koenäytettä. Näyte A:n proteiinilisä
sisälsi heraproteiinia 12,5 g/litra, näyte B:n proteiinilisä sisälsi heraproteiinia ja soi-
japroteiinia yhteensä 12,5 g/litra, mistä soijaproteiinia oli 10 % ja näyte C:n protei-
inilisä sisälsi heraproteiinia ja soijaproteiinia yhteensä 12,5 g/litra, mistä soijaproteiinia
oli 20 %. 12,5 g proteiinilisään punnittiin heraproteiiniseosjauhetta 14,7 g/litra.
Tämä oli samaa kylmäkuivattua heraproteiinijauhetta kuin esimerkissä 6.

15 10 % proteiinilisä sisältää proteiinia 1,25 g. Tämän suuruiseen proteiinimääriään
tarvittiin soijaproteiinia (DANPRO S-900 TS; Central Soya) 1,8 g.

Näyte A:han punnittiin kylmäkuivattua heraproteiinijauhetta 14,7 g/litra, näyte
B:hen punnittiin samaa heraproteiinijauhetta 13,2 g/litra ja soijaproteiinijauhetta 1,8
g/litra sekä näyte C:hen samaa heraproteiinijauhetta 11,8 g/litra ja soijaproteiinijau-
hetta 3,6 g/litra. Proteiinijauheet sekoitettiin keskenään ja lisättiin rasvatomaan
maitoon litraksi huolellisesti sekoittaaen. Proteiiniseos sekoitui ja liukeni hyvin maito-
on. Tämän jälkeen näytteet pastöroitiin 80 °C:ssa 15 min ja jäähdytettiin 44
°C:seen.

25 Hapanneena käytettiin Valio Oy:n valmistamaa maustamatonla jugurtia 4 % (0,5
litran tölkki, Tampere). Hapanneinen kesti 43 °C:ssa 4,5 tuntia ja näytteiden pH:t
olivat 4,55–4,60. Näytteet jäähdytettiin 20 °C:seen, muokattiin sekoittamalla ja siir-
rettiin jäätkaappiin.

30 Koenäytteistä määritettiin SH-ryhmät, μ mol/g proteiinia Ellmanin reagenssilla:

Koenäyte/ SH μ mol/ g proteiinia	A	B	C
Rasvaton maito + protciinicos	15,2	15,0	14,8
Pastöroinnin jälkeen	17,3	17,2	15,3

Koenäytteistä määritettiin viskositeetti yhden vuorokauden jälkeen valmistuksesta
35 10 °C:ssa Brookfield DV 1Viscometer -lainteella (Kara 3, kierrosnopeus 12).

Näytteiden viskositetit olivat

Koenäyte/viskositetti	A	B	C
mPas	9400	9000	8500

5 Näyte A: rakenne kiinteä ja tanakka; maku miellyttävä, raikas ja pehmeä.
 Näyte B ja C: rakenne kiinteä ja tasainen; maku miedon soijainen molemmissa, ei kuitenkaan häiritsevän voimakas.

10 Esimerkki 9

Rasvatonta jogurtia valmistettiin vertailunäyte ja kolme koenäytettä. Vertailunäytteen proteiinilisä oli gelatiinia. Koenäyte 1:n ja proteiinilisän määrä oli 10 g/litra sekä näyte 2:n ja 3:n 12,5 g/litra. Näytteissä 1 ja 2 proteiinilisänä käytettiin esimerkissä 6 käytettyä kylmäkuivattua proteiiniseosta ja näytteessä 3 proteiinilisänä käytettiin esimerkissä 7 käytettyä muunnetun heraproteiinijauheen ja heraproteiinikonseutraattijauheen seosta.

20 Näyte 1:een punnittiin kylmäkuivattua proteiiniseosta 12,0 g/liua ja 2:een 14,7 g/litra. Näyte 3:een punnittiin heraproteiinijauheseosta 16,2 g/litra. Vertailunäytteen punnittiin gelatiinia 4 g/litra (Extragu). Proteiiniseos jauheet sekoitettiin huolellisesti rasvattomaan maitoon litraksi. Näyte 1:een ja 2:een lisätty proteiiniseos liukkeni melko hyvin kylmään maitoon. Näyte 3:een lisätty proteiiniscois liukcni lämmittelyyn (20–30 °C) maitoon hyvin. Vertailunäytteen gelatiini sekoitettiin maitoon yli 25 50 °C:n lämpötilassa. Tämän jälkeen näytteet pastöroitiin 80 °C:ssa 15 min ja jäädytettiin 42 °C:seen.

30 Hapatteena käytettiin Jo-Mix VM 1-30 (Danisco Cultor) jogurttihapatetta 5 g/litra. Hapatus tapahtui 42 °C:ssa ja se kesti vertailunäytteellä 3 tuntia 30 minuuttia pH 4,5:n saavuttamiseksi ja koenäytteillä 3 tuntia 50 minuuttia, jolloin hapatus lopetettiin. Näytteet jäädytettiin alle 20 °C:seen, muokattiin sekoittamalla ja siirrettiin kylmiöön.

35 Näytteistä mitattiin pH ja viskositetti kaksi päivää valmistuksen jälkeen ja suoritettiin aistinvarainen arvionti. Viskositetti mitattiin Bohlin Visco (V) 88 o 30; system 3 -laitteella, nopeus 1.

Näyte	pH	Viskositetti mPas
Vertailunäyte	4,32	1413
Koenäyte 1	4,33	1467
Koenäyte 2	4,36	1635
Koenäyte 3	4,36	1547

Aistinvaraincn arvointi:

5 Vertailunäyte: ei heraa pinnalla, sileä, paksu rakenne
 Koenäyte 1: ei heraa pinnalla, paksumpi vertailunäytettä, sileä, ei sivumakua
 Koenäyte 2: ei heraa pinnalla, paksu rakenne, hiutaleinen, ei sivumakua
 Koenäyte 3: ei heraa pinnalla, paksu rakenne, hiutaleinen, ei sivumakua

10

Esimerkki 10

15 Vehnäjauhoista leivottiin taikina, joka sisälsi muunnettua heraproteiinia ja vastaava vertailutaikina ilman muunnettua proteiinia. Taikinoiden venyvyyttä verrattiin toisiinsa. Venyvyys mitattiin ekstensografiilla.

20 Vertailutaikina sisälsi 300 g vehnäjauhoja ja 2 g suolaa, jotka liuotettiin osaan vettä ja 212 ml vettä. Koetaikina sisälsi 300 g vehnäjauhoja ja 2 g suolaa, jotka liuotettiin osaan vettä, 211 ml vettä ja 4,5 g muunnettua heraproteiinia. Muunnetun heraproteiinin määrä oli 1,5 % jauhojen painosta.

25 Taikinat valmistettiin koetaikinan tcko-ohjccn mukaan. Vertailutaikinan teossa oli ongelmana taikinan tarttuminen kaulimeen. Tämän takia taikinapallon pinnalla jouduttiin käyttämään vähän jauhoja. Vastaava määrä jauhoja lisättiin myös koetaikinapallon pinnalle. Määritysten aikana voitiin havaita eroja taikinapalloissa; vertailutaikina oli pchmcämpää ja tarttuvampaa sekä veikcammin käsittelyvää kuin koetaikina, joka oli kimmoisampaa ja vähemmän tarttuvaa.

Taulukossa on esitetty ekstensogrammin tunnusluvut vertailu- ja koetaikinalla.

Koetaikinan ja vertailutaikinan ekstensogrammin tunnusluvut

Koetaikina sisälsi 1,5 % muunnettua heraproteiinia ja 0,7 % suolaa jauhojen painosta ja vertailutaikina suolaa 0,7 % jauhojen painosta.

5

TUNNUSLUKU ka	KOETAIKINA			VERTAILUTAIKINA		
Nostatusaika (min)	45	90	135	15	90	135
Venyyvyys A (mm)	205	171,5	178	241	205	178
Venyyvyysvastus B (BU)	380	570	600	305	472,5	515
Pinta-ala (cm ²)	98,3	118,9	107,5	82,7	107,5	103,8
B/A	1,85	3,32	3,37	1,27	2,30	2,89
Aistinvarainen arvio	Taikina kimmoisampaa ja lyhyempää			Taikina pehmeämpää ja venyyvämpää		

10 Ekstensogrammin tulosten perusteella todetaan, että taikinoissa oli selkeät erot. Venyyvyys oli koetaikinalla pienempi kuin vertailutaikinalla ja venyyvyysvastus ja pinta-ala olivat suuremmat. Tunnusluku B/A oli koetaikinalla suurempi kuin vertailutaikinalla. Koetaikina oli myös aistinvaraisesti kimmoisampaa ja lyhyempää sekä jäykempää kuin vertailutaikina.

15 Näiden tulosten perusteella voidaan sanoa, että muunnettulla heraproteiinilla oli selkeä vaikutus taikinaa vahvistavasti; koetaikina, jossa oli 1,5 % muunnettua heraproteiinia, oli kiimmoisampi, valivempää ja jäykempi. Ekstensiogrammin muodot olivat sellaiset, että ne ennakoivat hyvää leivän tilavuuspotentiaalia.

20 Edellä on kuvattu eräitä keksinnön mukaisia suoritusmuotoja. Keksintö ei rajoitu juuri kuvattuihin ratkaisuihin. Esimerkiksi menetelmää voidaan soveltaa muihinkin proteiinipitoisiin tuotteisiin ja elintarvikkeisiin kuin edellä on mainittu. Keksinnöillä ajatuksia voidaan soveltaa lukuisilla tavoilla patenttivaatimusten asettamissa rajoissa.

L2

25

Patenttivaatimukset

1. Menetelma proteiinipitoisten tuotteiden rakenteen vahvistamiseksi tuotteen lämpökäsittelyn aikana muodostamalla proteiinien välille disulfidisidoksia, jolloin proteiinit muodostavat avaruusverkon, tunnettu siitä, että tuotteeseen lisätään ennen lämpökäsittelyä muunnettua proteiinia, joka on muunnettua avaamalla ainakin yksi proteiinissa alun perin oleva disulfidisidos vapaiden sulfhydryyliryhmien saamiseksi, ja mainitun lämpökäsittelyn seurauksena mainitut vapaat sulfhydryyliryhmät saavat aikaan välttoreaktion, jossa mainittuja rakennetta vahvistavia disulfidisidoksia muodostuu proteiinien välille.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelma, tunnettu siitä, että proteiini on muunnettua saattamalla se kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonointiseksi.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelma, tunnettu siitä, että mainittu sulfiitti-ion ja muodostava reagenssi käsitteää alkalimetallin tai maa-alkalimetallin sulfiitia, vety sulfiitia tai metabisulfiitia tai näiden yhdistelmiä.
4. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelma, tunnettu siitä, että vapaita sulfhydryyliryhmiä on tuotteen kokonaisproteiinissa ennen vaihtomuuttoa 0,5–60 $\mu\text{mol/g}$ proteiinia.
5. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelma, tunnettu siitä, että muunnettua proteiini käsitteää mitä tahansa syötäväksi kelpaavaa proteiinia.
6. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelma, tunnettu siitä, että muunnettua proteiini käsitteää hiruproteiinia.
7. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelma, tunnettu siitä, että muunnettua proteiini käsitteää soijaproteiinia.
8. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelma, tunnettu siitä, että proteiinipitoisen tuote on elintarvike, rehu tai kotiläimen ruoka.
9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelma, tunnettu siitä, että mainittu elintarvike on jogurtti, viili, vanukas, levite, muu maitotuote tai taikina.

10. Proteiinipitoinen tuote, joka käsittää lämpökäsittelyssä syntyneen tuotteen rakennetta vahvistavan proteiinien välisten disulfidisidosten muodostaman proteiinien avaruusverkon, tunnettu siitä, että mainittu proteiinien avaruusverkko on luotu lisäämällä ennen lämpökäsittelyä tuotteeseen muunnettua proteiinia, joka on muunnettua avaamalla ainakin yksi proteiinissa alun perin oleva disulfidisidos vapaiden sulfhydryyliryhmien saamiseksi, jolloin mainitut rakennetta vahvistavat disulfidisidokset oval syntyneet mainittujen vapaiden sulfhydryyliryhmien aikaansaamassa vaihtoreaktiossa mainitun lämpökäsittelyn seurauksena.

5 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että mainittu proteiini on muunnettua saatamalla se kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi.

10 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että mainittu sulfiitti-ioneja muodostava reagenssi käsittää alkalimetallin tai maa-alkalimetallin sulfiittia, vetysulfiittia tai metabisulfiittia tai näiden yhdistelmiä.

15 13. Jonkin patenttivaatimuksen 10-12 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että vapaita sulfhydryyliryhmiä on tuotteen kokonaisproteiinissa ennen vaihtomuuntoa 0,5-50 $\mu\text{mol/g}$ proteiinia.

20 14. Jonkin patenttivaatimuksen 10-13 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että mainittu muunnettua proteiini käsittää mitä tahansa syötäväksi kelpaavaa proteiinia.

25 15. Jonkin patenttivaatimuksen 10-14 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että mainittu muunnettua proteiini käsittää heraproteiinia.

30 16. Jonkin patenttivaatimuksen 10-15 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että mainittu muunnettua proteiini käsittää soijaproteiinia.

35 17. Jonkin patenttivaatimuksen 10-16 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että mainittu tuote on elintarvike, rehu tai kotieläimen ruoka.

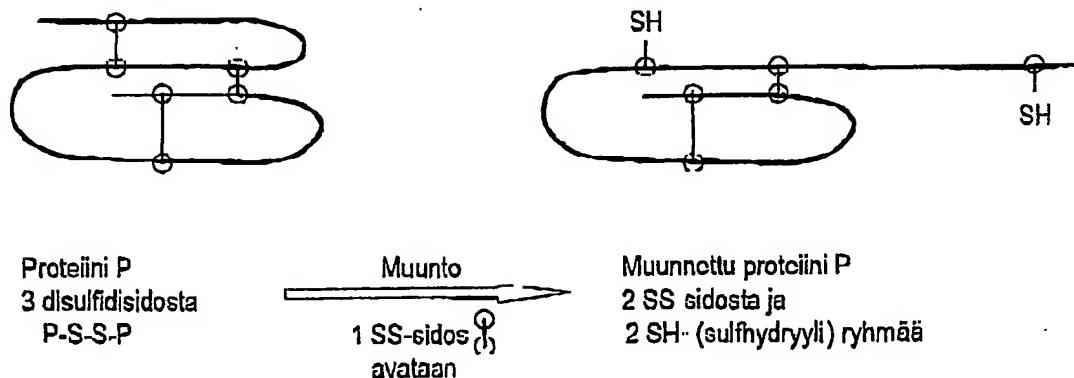
18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen proteiinipitoinen tuote, tunnettu siitä, että mainittu clintarvike on jogurtti, viili, vanukas, levite, muu maitotuote tai taikina.

L3

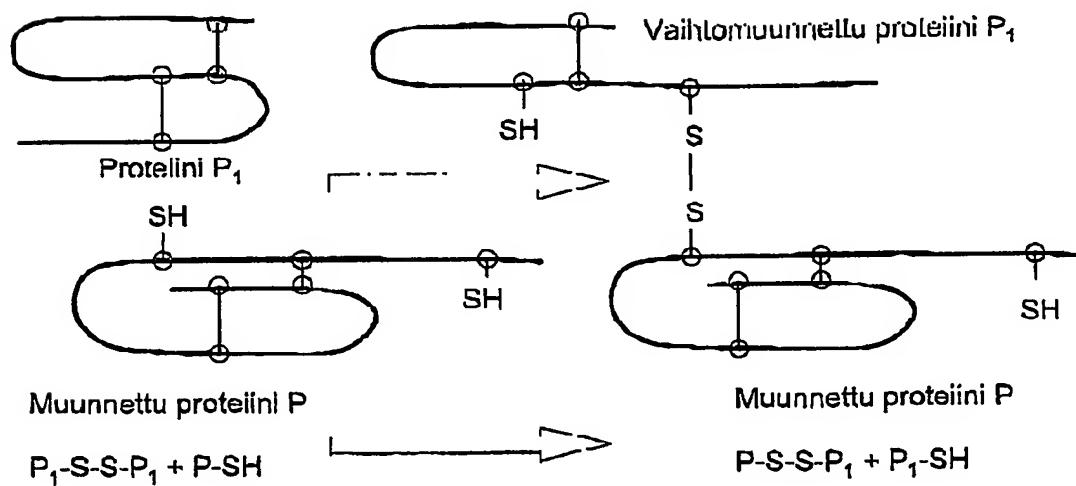
(57) Tiiivistelmä

Keksinnön kohteena on menetelma proteiinipitoisten tuotteiden, kuten elintarvikkeiden, rakenteen vahvistamiseksi muunnetun proteiinin avulla lämpökasittelyssä muodostamalla proteiinien välille disulfidisidoksin, jolloin proteiinit muodostavat avaruusverkon. Keksinnön kohteena on myös menetelmällä valmistettu tuote.

L4



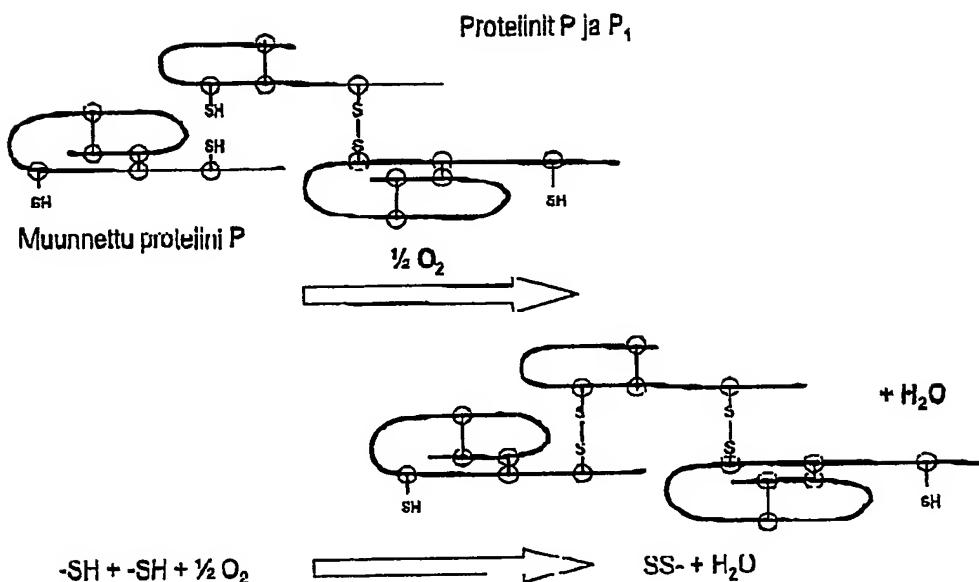
Kuva 1



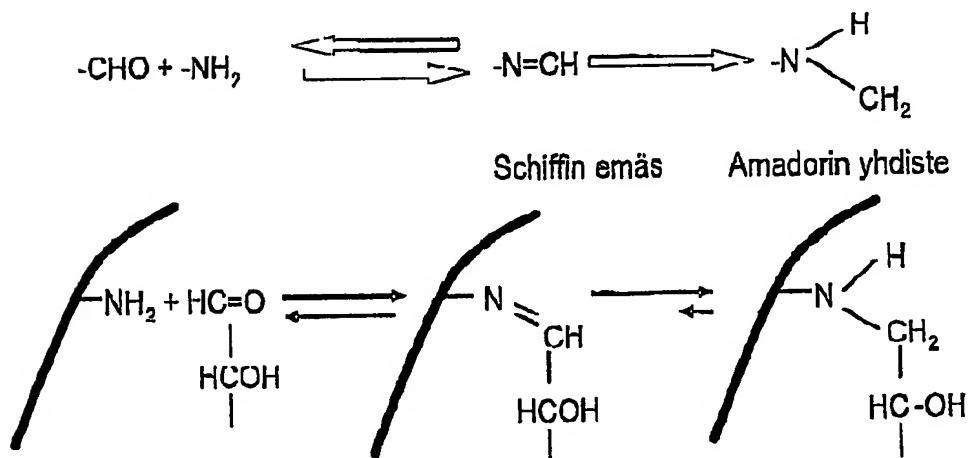
Kuva 2

L4

2

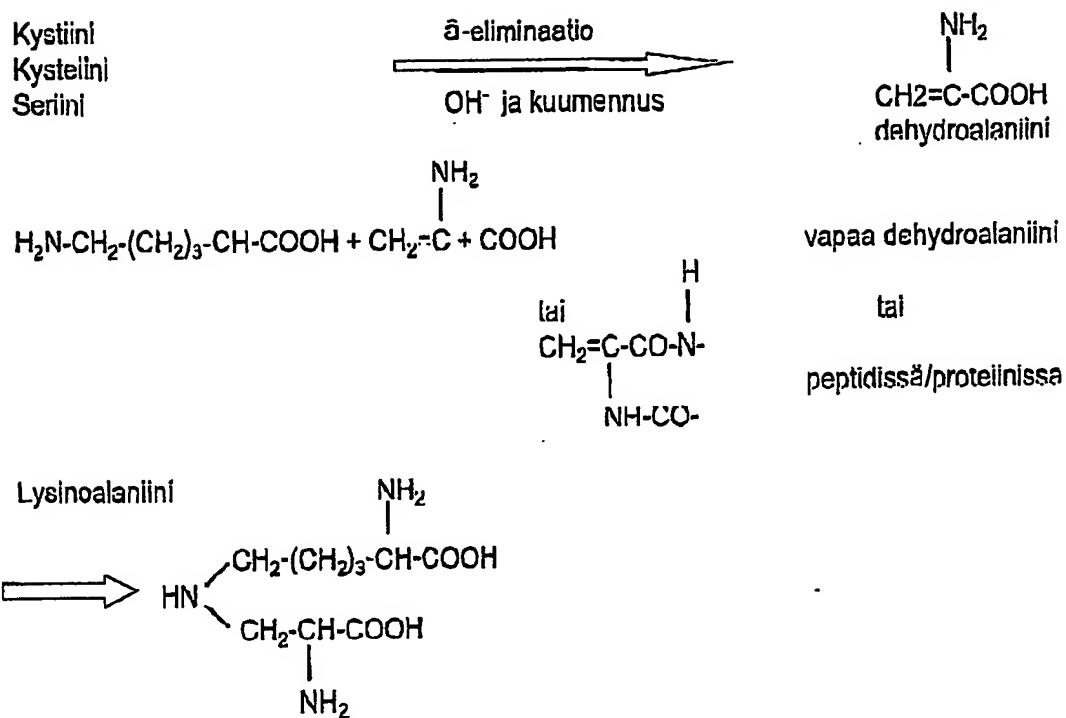


Kuva 3

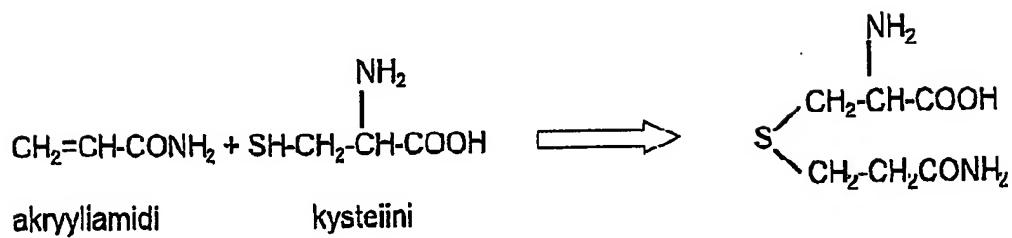


Kuva 4

24



Kuva 5



Kuva 6

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FI04/000619

International filing date: 15 October 2004 (15.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FI
Number: 20031506
Filing date: 15 October 2003 (15.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 December 2004 (03.12.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.